



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

MARCADORES SALIVARES NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Trabalho submetido por
Carla Sofia de Salema Vieira
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

MARCADORES SALIVARES NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Trabalho submetido por
Carla Sofia de Salema Vieira
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Véronique Harrington Sena

Setembro de 2020

*“Recomeça...
Se puderes
Sem angústia e sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
(...)”*

Miguel Torga

Para o meu querido pai.

Agradecimentos

A elaboração da presente dissertação foi sem dúvida, para mim, o maior desafio destes últimos cinco anos de curso. Foi, sem o ser, um trabalho de equipa, e por isso não posso deixar de agradecer a todos aqueles que por todo o apoio, força e motivação demonstrada ao longo deste percurso, fizeram com que isto fosse possível.

À minha orientadora, por toda a paciência, apoio, motivação e acompanhamento ao longo destes meses. Obrigada pela confiança depositada em mim desde o início e principalmente por todas as palavras de compreensão e motivação nos momentos certos.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e sempre fizeram de tudo para que não me faltasse nada, a mim e aos meus irmãos. Sei que queriam tanto quanto eu que estes 5 anos terminassem com sucesso, e acredito que estejam orgulhos de todo o meu percurso.

Aos meus irmãos, ao Bruno, por todo o carinho e apoio demonstrados nos momentos de maior cansaço, e principalmente à Filipa, que me acompanhou ao longo destes últimos 5 anos, foi também minha colega de box, proporcionando-me os momentos mais caricatos na clínica e que hoje guardo no coração por os ter partilhado com ela. Obrigada por todo o companheirismo, nem fazia sentido terminar isto sem ti!

Aos meus avós, cujo maior desejo é ver os netos formados, por toda a ajuda e palavras de força constantes, nada me deixa mais feliz por poder tê-los ao meu lado a aplaudir as minhas conquistas..

Aos meus amigos de sempre, que sem saberem, não imaginam a importância que tiveram nos momentos de maior frustração e fraqueza, e me lembraram sempre que a vida não se resume a estudar e a trabalhar e que a vida é demasiado boa para não ser aproveitada.

Aos meus colegas de Medicina Dentária, que se tornaram amigos, por toda a amizade. Se isto aconteceu por alguma razão, tenho a certeza que também foi por vocês.

E por fim, ao Duarte, a quem um obrigada nunca vai chegar. Mas Obrigada!

RESUMO

A detecção precoce de uma doença desempenha um papel fundamental para a formulação de um correto plano de tratamento e prognóstico. A saliva é um fluido biológico cada vez mais utilizado como meio de investigação de diversas patologias, uma vez que a colheita e processamento das amostras é simples, económico e preciso, e não causa desconforto ao doente. Os seus constituintes podem ser utilizados como marcadores que podem revelar doenças sistémicas e ajudar no diagnóstico, prognóstico e seu tratamento.

Devido à relação próxima entre as glândulas salivares e o sistema nervoso e o avanço dos métodos de detecção e quantificação dos seus constituintes, a procura de marcadores salivares para as doenças neurológicas tem sido cada vez mais investigada.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crónica inflamatória do sistema nervoso central, incapacitante, que se manifesta em adultos jovens (20-40 anos) e cuja incidência tem aumentado nas últimas décadas em todo o mundo. A EM é uma doença desmielinizante e neurodegenerativa de evolução clínica muito variável, provavelmente heterogénea nos seus mecanismos patogénicos, para a qual podem contribuir múltiplos fatores genéticos e ambientais. Embora tenham existido numerosos progressos no diagnóstico e tratamento da EM, os biomarcadores reconhecidos como indicadores da sua evolução no doente individual são sobretudo biomarcadores de imagem e marcadores medidos no líquido cefalorraquidiano. A busca de biomarcadores acessíveis e económicos para os complementar permanece uma tarefa desafiadora e de grande interesse clínico, pois poderá possibilitar terapêuticas mais personalizadas para cada tipo de indivíduo.

O objetivo deste trabalho consiste em, através de uma revisão bibliográfica, compreender quais os potenciais marcadores salivares relevantes para o diagnóstico e prognóstico da EM.

Para a realização deste trabalho foi efetuada uma revisão da literatura científica existente recorrendo às bases de dados como PubMed, B-on, Cochrane e ScienceDirect.

Palavras – Chave: Biomarcadores Salivares, Esclerose Múltipla, Doença Neurodegenerativa, Inflamação

ABSTRACT

Early detection of a disease plays a key role in formulating a correct treatment plan and prognosis. Saliva is a biological fluid increasingly used as a tool for investigating various pathologies, since its collection and processing of samples are simple, economical and accurate, and do not cause discomfort to the patient. Its constituents can be used as markers that can reveal systemic diseases and aid in diagnosis, prognosis and treatment.

Due to the close relationship between the salivary glands and the nervous system and the advancement of methods of detection and quantification of their constituents, the search for salivary markers for neurological diseases has been increasingly investigated.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system, disabling, that manifests in young adults (20-40 years) and whose incidence has increased worldwide in recent decades. MS is a demyelinating and neurodegenerative disease, of very variable clinical evolution and probably heterogeneous in its pathogenic mechanisms which multiple genetic and environmental factors can contribute. Although there have been numerous advances in the diagnosis and treatment of MS, the biomarkers recognized as indicators of their evolution in the individual patient are mainly imaging biomarkers and markers measured in cerebrospinal fluid. The search of affordable and economical biomarkers to complement them remain a challenging task and of great clinical interest, as it may enable more personalized therapies for each type of individual.

The objective of this work is to understand, through a literature review, which potential salivary markers are relevant for the diagnosis and prognosis of MS.

For the accomplishment of this work, a review of the existing scientific literature was selected through PubMed, B-on, Cochrane and ScienceDirect.

Keywords : Salivary Biomarkers, Multiple Sclerosis, Neurodegenerative Disease, Inflammation

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	11
DESENVOLVIMENTO.....	15
1. A saliva como ferramenta de diagnóstico.....	15
1.2. Funções da Saliva	17
1.3. Saliva vs Sangue	18
1.4. Vantagens e Desvantagens da saliva como meio de diagnóstico	18
2. Biomarcadores	19
2.1. Definição.....	20
2.2. Classificação	20
2.2.1. Biomarcadores preditivos	20
2.2.2. Biomarcadores de diagnóstico	20
2.2.3. Biomarcadores de monitorização da doença.....	21
2.2.4. Biomarcadores de resposta terapêutica	21
2.3. Características ideais de um biomarcador	21
2.4. Aplicação dos biomarcadores	22
3. A Esclerose Múltipla	22
3.1. Características gerais	22
3.2. Fisiopatologia	23
3.3. Epidemiologia.....	26
3.4. Etiologia.....	27
3.5. Sintomas clínicos	27
3.6. Curso Clínico	29
3.6.1. Terapêutica.....	29
3.7. Diagnóstico	30
3.7.1. Biomarcadores biológicos na Esclerose Múltipla.....	31
3.7.2 Biomarcadores Salivares na Esclerose Múltipla.....	36
3.7.2.1. Imunoglobulina A	36
3.7.2.2. Sistema de Antígeno Leucocitário Humano, Classe II ..	37
3.7.2.3. Produtos do Stress Oxidativo	37
CONCLUSÃO.....	41

BIBLIOGRAFIA	43
---------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Técnica da Punção Lombar (imagem disponível em: http://depts.washington.edu/mbwc/adrc/page/lumbar-punctures-faqs-and-myths)	12
Figura 2 - Localização das glândulas salivares (Parótida, submandibular e sublingual) e inervação das mesmas (adaptado de Forde et al., 2006).....	15
Figura 3 - Mecanismos de transporte, implicados na produção de saliva (adaptado de Haeckel & Hänecke, 1996).....	16
Figura 4 – Neurónio mielinizado e neurónio desmielinizado (imagem disponível em: https://drauziovarella.uol.com.br/doencas-e-sintomas/esclerose-multipla/)	23
Figura 5- Esquema da substância branca e substância cinzenta (imagem disponível em: https://curiosoando.com/que-es-la-sustancia-gris)	24
Figura 6 – Esquema detalhado do axónio (adaptado de Bear et al., 2017, p.52)	25
Figura 7- Diferenças entre um cérebro saudável (A) e um cérebro com EM (B). (adaptado de Ortiz et al., 2014).	26
Figura 8- Possíveis causas da EM (adaptado de Lemus, Warrington & Rodriguez, 2018).....	27
Figura 9 – Órgãos e sistemas do corpo humano afetados na EM (imagem disponível em: https://www.sanofi.com.br/pt/sua-saude/esclerose-multipla).....	28
Figura 10 - Componentes do citoesqueleto (adaptado de Bear et al., 2017, p.39)	34
Figura 11- Comparação entre os níveis de HLA classe II solúvel na saliva de pacientes com EM e pacientes saudáveis (adaptado de Adamashvili et al., 2005).	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e Desvantagens da detecção de biomarcadores no sangue e no LCR (adaptado de Ziemssen et al., 2019).	31
---	----

LISTA DE SIGLAS

BHE – Barreira Hematoencefálica

Anti-MBP – Anti-proteína Básica da Mielina

Anti-MOG – Anti-glicoproteína da Mielina Oligodendrocitária

BOC – Bandas Oligoclonais

CAM – Moléculas de Adesão Celular

CHI3L1 - Chitinase 3 Like 1

CNTF – Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica

EM – Esclerose Múltipla

EMPP – Esclerose Múltipla Primária Progressiva

EMPS – Esclerose Múltipla Progressiva com Surto

EMSP – Esclerose Múltipla Secundária Progressiva

EMSR – Esclerose Múltipla Surto-Remissão

ERA – Espécies Reativas de Azoto

ERO – Espécies Reativas de Oxigénio

FDA – Food and Drug Administration

FLC – Cadeias Leves Livres

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein

HLA – Sistema de Antígeno Leucocitário Humano

Ig – Imunoglobulinas

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MAP – Microtubule associated protein

MHC – Major Complex Histocompatibility

MS – Multiple Sclerosis

Na⁺ - Sódio

NIH – National Institutes of Health

O₂ - Oxigênio

RM – Ressonância Magnética

sHLA-II - HLA solúvel classe II

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SO – Stress Oxidativo

INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas são um conjunto de doenças que afeta tanto o sistema nervoso central como o sistema nervoso periférico (Bertram & Tanzi, 2005; Landrigan et al., 2005), altamente incapacitantes e que têm vindo a aumentar a um ritmo exponencial.

Em vários distúrbios neurológicos deste grupo de doenças ocorre um processo irreversível, designado por neurodegeneração, que causa uma perda lenta e progressiva da função de populações de neurónios específicos e das suas conexões, podendo induzir distúrbios no funcionamento do sistema motor, do sistema sensorial, das capacidades cognitivas e do comportamento. Vários mecanismos moleculares como a excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, inclusões intracelulares ou agregação extracelular de substâncias moleculares tóxicas estão implicados na morte das células nervosas (Bossy-Wetzel, Schwarzenbacher & Lipton, 2004). Assim, a deteção precoce de doenças deste foro é fundamental na atribuição da terapêutica adequada para os pacientes afetados (DeKosky & Marek, 2003).

A esclerose múltipla (EM) é a doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) de evolução progressiva e incapacitante mais comum entre os adultos jovens. O seu curso clínico é altamente variável, refletindo a complexidade da sua fisiopatologia. Diferentes mecanismos de desmielinização-inflamação, neurodegeneração axonal, gliose e reparo pela remielinização combinam-se em vários graus (influenciados por fatores idiossincráticos) para criar um resultado clínico único para cada paciente. Identificar esses fatores idiossincráticos, bem como entender qual o mecanismo proeminente em cada caso, é o primeiro passo para uma escolha terapêutica racional (Farah et al., 2018).

No entanto, o diagnóstico continua a ser um desafio para estas doenças que afetam o SNC devido à manifestação tardia dos sintomas e consequentemente, início do tratamento também tardio, o que diminui a eficácia deste. Geralmente os testes realizados para o diagnóstico da EM incluem a análise ao sangue e ao líquido cefalorraquidiano (LCR), através da punção lombar (ver Fig. 1), sendo que a sua natureza invasiva resulta normalmente em desconforto, dor e efeitos colaterais desagradáveis para os pacientes, o que exige uma procura de informações precisas e avançadas e métodos de diagnóstico menos invasivos (Evans, 2008). Assim, orientar a pesquisa para encontrar biomarcadores fiáveis para avaliar a atividade da doença, neurodegeneração e resposta terapêutica, é de uma importância primordial (Farah et al., 2018).

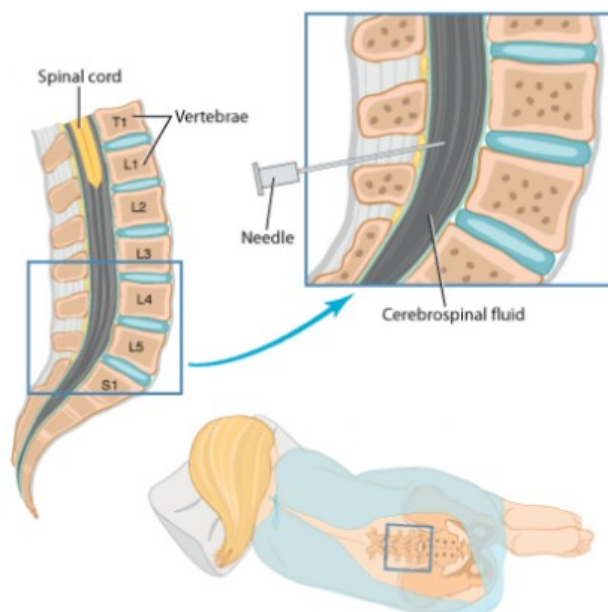


Figura 1 - Técnica da Punção Lombar (imagem disponível em: <http://depts.washington.edu/mbwc/adrc/page/lumbar-punctures-faqs-and-myths>)

Nas últimas décadas, o esforço para estabelecer biomarcadores satisfatórios para a esclerose múltipla (EM) tem-se mostrado muito difícil, devido às complexidades clínicas e fisiopatológicas da mesma e das grandes diferenças interindividuais. Contudo, o conhecimento recentemente adquirido nos domínios da genômica-imunogenética e neuroimunologia, bem como a evolução da neuroimagem, permitiu estabelecer uma lista totalmente nova de biomarcadores. Essa variedade, no entanto, leva inevitavelmente à confusão no esforço de tomada de decisão em relação à estratégia terapêutica e individualizada (Harris, Tuddenham & Sadiq, 2017).

Lesko e Atkinson definem o termo “biomarcador” como "uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica" (Lesko & Atkinson, 2001).

Os biomarcadores podem ser de diversos tipos, tais como, fisiológicos (funções de órgãos), físicos (alterações características em estruturas biológicas), histológicos (amostras de tecido obtidas por biópsia) e anatômicos. Podem ser células específicas, moléculas, genes, enzimas ou mediadores químicos. Provavelmente os mais relevantes em investigação médica são os marcadores bioquímicos que podem ser obtidos com

relativa facilidade a partir de fluidos corporais (sangue, LCR, urina e saliva) e que estão ao dispor dos investigadores (Gasser, 2009).

A saliva é um fluido biológico dinâmico e complexo, com capacidade de refletir tanto estados fisiológicos como de doença e, por isso, tem sido utilizada como ferramenta laboratorial para monitorizar os indivíduos (Lima, Diniz, Moimaz, Sumida & Okamoto, 2009). Um largo espectro de substâncias é encontrado na saliva, desde moléculas e iões de ocorrência natural, resultantes da atividade metabólica, hormonal, neurológica ou imunológica, até compostos introduzidos no organismo para fins terapêuticos ou recreativos (Lee, Garon & Wong, 2009; Malathi, Mythili, & Vasanthi, 2014).

A saliva surge, então, como uma ótima ferramenta de diagnóstico para os pacientes com doenças neurológicas, no sentido em que apresenta inúmeras vantagens comparativamente com os outros fluidos corporais, atualmente utilizados e já referidos anteriormente. Os benefícios da saliva estão relacionados com a facilidade de colheita de forma não invasiva, diminuindo o desconforto para o doente; a maior segurança para o profissional de saúde; o fácil armazenamento e transporte; e, ainda, o facto de ser obtida a baixo custo e de maneira repetida, permitindo a monitorização da doença ao longo do tempo e dos efeitos terapêuticos (Lee & Wong, 2010; Malathi et al., 2014).

Como as doenças do foro neurológico afetam de uma forma marcada e generalizada as populações a nível mundial, a determinação de marcadores biológicos na saliva torna-se cada vez mais um método adicional ou primário não invasivo de diagnóstico e, por consequência, de grande utilidade no âmbito da Ciência e Medicina.

Nesta revisão bibliográfica pretendo expor os marcadores mais relevantes da EM e os estudos atuais relativos à saliva, com o intuito de fortalecer a plausibilidade da saliva como meio de diagnóstico auxiliar da doença. Como se verá, há ainda um longo caminho a percorrer.

DESENVOLVIMENTO

1. A saliva como ferramenta de diagnóstico

1.1. Propriedades e fisiologia da saliva

A saliva humana é um fluido biológico complexo e dinâmico, que resulta da mistura dos fluidos provenientes das glândulas salivares, do exsudato da mucosa oral, do muco originado na cavidade nasofaríngea, descamação epitelial, bactérias, fluido crevicular, eventualmente algumas células sanguíneas e restos alimentares (de Almeida, Grégio, Machado, de Lima & Azevedo, 2008).

A saliva é constituída maioritariamente por água, cerca de 99%, 0,3% de proteínas e 0,1% por compostos orgânicos e inorgânicos (Liu & Duan, 2012). Nestes compostos encontram-se enzimas, péptidos, glicoproteínas, imunoglobulinas, hormonas e eletrólitos como o sódio potássio, cálcio, magnésio, fosfatos. A maior parte das moléculas presentes na saliva são produzidas pelas três glândulas salivares major, como a parótida (23%), submandibular (65%) e sublingual (4%) (Fig. 2), e por numerosas glândulas salivares minor (8%) que se encontram espalhadas pela mucosa oral. A regulação da secreção salivar é neuromediada, sendo o volume e o tipo de saliva controlados pelo sistema nervoso autónomo (SNA), mais especificamente pelos neurónios do sistema parassimpático pertencentes aos nervos cranianos facial (VII), glossofaríngeo (IX) e vago (X) (Fig. 2) e do sistema simpático (Reale, Gonzales-Portillo & Borlongan, 2020).

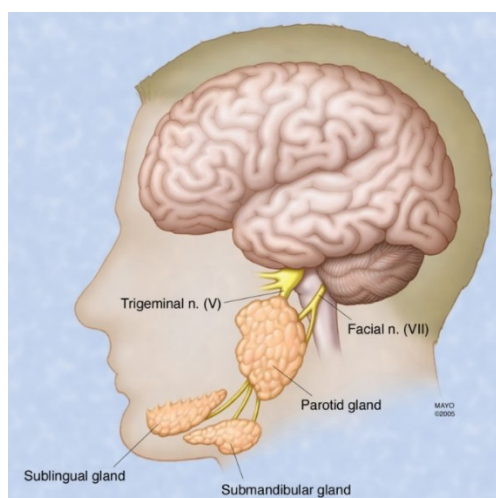


Figura 2 - Localização das glândulas salivares (Parótida, submandibular e sublingual) e inervação das mesmas (adaptado de Forde et al., 2006).

A saliva é gerada nas glândulas salivares por células acinares, coletada em pequenos ductos e, posteriormente, libertada na cavidade oral (Fig. 3). As glândulas salivares são ricamente vascularizadas e contêm capilares altamente permeáveis aos diversos constituintes do sangue (Fig. 3). A passagem e troca de moléculas provenientes do sangue com as células produtoras de saliva adjacentes, as células acinares, ocorre ou por via transcelular (difusão passiva e transporte ativo) ou por via paracelular. Por outro lado, as células ductais são responsáveis pela modificação e transferência da saliva para a cavidade oral através dos mesmos meios de transporte acima referidos ou através da fenda gengival (Malathi et al., 2014; Reale et al., 2020).

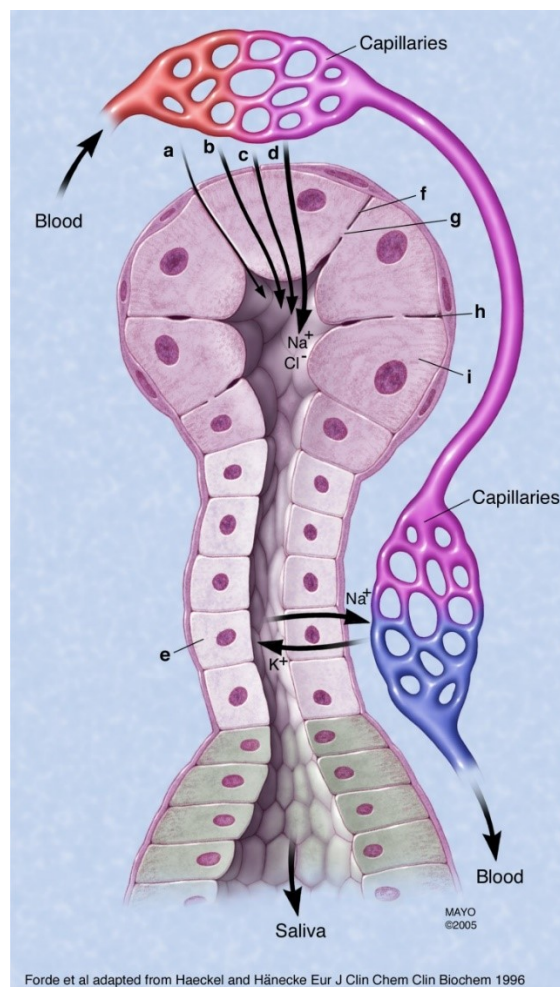


Figura 3 - Mecanismos de transporte, implicados na produção de saliva (adaptado de Haeckel & Hänecke, 1996). a- Transporte ativo; b- Difusão passiva; c- Filtração simples; d- As células acinares bombeiam íons de sódio (Na^+) para os ductos; e - As células ductais bombeiam íons de Na^+ de volta para o sangue; f- Membrana celular; g- Poro nuclear; h- Espaço intracelular; i- Célula acinar.

Assim, muitos componentes encontrados no sangue também estão presentes na saliva, e consequentemente a composição deste fluido oral poderá refletir o estado de saúde do indivíduo (Yoshizawa et al., 2013). Contudo, é importante referir que a composição química da saliva pode variar devido a inúmeros fatores, nomeadamente a idade, o género e o estado geral do indivíduo (Pandey, 2014). O volume de saliva produzido, que varia num indivíduo saudável entre 0,5 a 1,5 litros por dia (Mese & Matsuo, 2007), também pode ser modificado por variadas condições fisiológicas e patológicas, como a estimulação por fatores mecânicos (o ato de mastigar), fatores sensoriais como o gosto, olfato e visão, fatores psicológicos como a ansiedade, fatores hormonais, medicamentos, faixa etária, higiene oral ou mesmo o próprio exercício físico (a desidratação característica deste ato leva a uma diminuição do fluxo salivar) (Walsh et al., 2004; Ekström, Khosravani, Castagnola & Messana, 2012).

1.2.Funções da Saliva

A saliva desempenha um papel crucial em muitas funções biológicas, como a percepção das sensações orais (isto é, a percepção do gosto, temperatura e textura), lubrificação, mastigação, deglutição e digestão dos alimentos. Além disso, ainda contribui na remineralização do esmalte dos dentes e evita a desmineralização devido à sua capacidade de tamponamento (Hicks, Garcia-Godoy & Flaitz, 2003; Garcia-Godoy & Hicks, 2008).

A sua capacidade tampão é conseguida devido à presença de iões bicarbonato e iões fosfato que possibilitam a manutenção do pH da saliva entre 6 e 7 (variação consoante o fluxo salivar). Esta característica da saliva impede a colonização de microrganismos potencialmente patogénicos, pois elimina as condições favoráveis ao seu desenvolvimento e ajuda a neutralizar e a eliminar os ácidos produzidos por microrganismos acidogénicos, evitando a desmineralização do esmalte (de Almeida et al., 2008; Ekström et al., 2012).

A saliva tem também uma função protetora da mucosa oral contra fatores biológicos, mecânicos e químicos, bem como contra infeções bacterianas, virais e fúngicas, mantendo o equilíbrio do ecossistema da cavidade oral (Jankowska, Waszkiel & Kowalczyk, 2007).

Este fluido biológico contém proteínas com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais relevantes (de Almeida et al., 2008), estando algumas destas

proteínas associadas ao sistema imunológico tais como as imunoglobulinas A (IgA), G (IgG) e M (IgM) (Humphrey & Williamson, 2001).

1.3. Saliva vs Sangue

A detecção precoce de uma doença desempenha um papel determinante no planeamento e prognóstico do tratamento (Malathi et al., 2014).

As fontes de diagnóstico obtidas nas consultas de rotina incluem exames citológicos (células, tecidos), fezes e urina, mas o sangue ou plasma continuam a ser a fonte mais comum de obtenção de biomarcadores. Contudo, cada vez mais se procuram alternativas a este procedimento, pois a sua colheita para além de desconfortável e invasiva, é muitas vezes problemática e traumática para os indivíduos, tornando a sua colheita difícil em pacientes pouco colaborantes (portadores de deficiências, crianças, idosos, hemofílicos ou recém-nascidos), para além de ser economicamente mais desvantajosa (Martí-álamo, Mancheño-franch, Marzal-gamarra & Carlos-fabuel, 2012; Yoshizawa et al., 2013; Zhang et al., 2014). Como já foi referido anteriormente, muitos dos componentes do sangue estão presentes também na saliva que, com os avanços das técnicas de detecção, poderá tornar-se uma parte importante do diagnóstico laboratorial e do seguimento de outras doenças de tecidos e órgãos.

1.4. Vantagens e Desvantagens da saliva como meio de diagnóstico

A saliva apresenta um grande potencial como fluido de diagnóstico, pois oferece inúmeras vantagens (quando comparada com o plasma ou sangue) (Lee et al., 2009; Pink et al., 2009; Pfaffe, Cooper-White, Beyerlein, Kostner, & Punyadeera, 2011; Malon, Sadir, Balakrishnan & Córcoles, 2014; Buczko, Zalewska & Szarmach, 2015; Mikkonen et al., 2016; Mirzaii-Dizgah, Mirzaii-Dizgah & Mirzaii-Dizgah, 2020), que são resumidos a seguir.

- Colheita fácil e não invasiva da amostra, permitindo que a mesma seja realizada pelo próprio doente, não sendo necessária uma qualificação profissional para o efeito, como acontece na colheita de sangue;

- Permite a recolha de quantidades menores de amostra;
- Pode ser colhida repetidamente num curto espaço de tempo;
- Boa cooperação por parte dos pacientes, pois é indolor e por isso os níveis de ansiedade estão reduzidos;
- Relação custo-benefício considerável;
- Fácil armazenamento e transporte, pois não sofre coagulação como o sangue;
- Oferece segurança aos profissionais de saúde, pois evita-se o risco de lesão percutânea e auto-contágio;
- Maior sensibilidade e correlação com os níveis sanguíneos;
- A nível ético e cultural a sua recolha também é mais aceite em comparação com a análise ao sangue.

A grande desvantagem em relação ao sangue e plasma, é que os marcadores biológicos se encontram em concentrações consideravelmente baixas na saliva (Ahmadi-Motamayel, Davoodi, Dalband & Hendi, 2010). Mas, segundo os autores Segal e Wong (2009), este problema poderá vir a ser ultrapassado com o desenvolvimento de novas tecnologias, sendo a saliva um meio de diagnóstico para doenças locais e sistémicas bastante promissor no futuro (Segal & Wong, 2009).

2. Biomarcadores

Na última década, assistiu-se a um esforço enorme em torno da investigação biomédica no campo dos biomarcadores. O sucesso de novos biomarcadores usados na prática clínica foi notório, trazendo inúmeros benefícios aos pacientes. Contudo, é justo afirmar que ainda não existe um número de biomarcadores clinicamente fiáveis e satisfatórios na prática clínica que pareça justificar todo o esforço envolvido neste campo de investigação (Holland, 2016).

2.1. Definição

O termo “biomarcador” ou “marcadores biológicos” pode-se definir como qualquer entidade, substâncias, agentes químicos, células, moléculas, genes, anticorpos, enzimas, metabolitos, proteínas ou hormonas corporais passíveis de serem quantificadas e mensuradas, cujas alterações nas suas concentrações podem ser associadas à instalação, progressão ou até à regressão de uma doença em particular, sendo assim utilizados como parâmetros de avaliação do indivíduo em situações fisiológicas e/ou patológicas (Maiese, 2009; Sahu et al., 2011; Yoshizawa et al., 2013).

É importante referir que os biomarcadores podem ser uma substância medida em fluidos corporais como o sangue, a saliva ou urina, ou pode consistir num parâmetro como, por exemplo, a pressão arterial ou a atividade cerebral (Shi, Caudle & Zhang, 2009).

2.2. Classificação

Os biomarcadores podem ser classificados com base na sua capacidade de prever, diagnosticar, monitorizar a doença e responder ao tratamento da mesma (Paul, Comabella & Gandhi, 2019).

2.2.1. Biomarcadores preditivos

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) e o *National Institutes of Health* (NIH) (2016), um biomarcador preditivo é usado para identificar indivíduos com maior probabilidade do que outros indivíduos, de experienciar um efeito favorável ou desfavorável da exposição a um fator de risco genético ou um agente ambiental.

2.2.2. Biomarcadores de diagnóstico

A FDA e a NIH referem que um biomarcador de diagnóstico existe para detetar ou confirmar a presença de uma doença ou para identificar indivíduos com um subtipo da doença.

2.2.3. Biomarcadores de monitorização da doença

Os biomarcadores de monitorização da doença permitem determinar o estadió da doença ou condição médica (Lassmann, Bruck & Lucchinetti, 2007).

2.2.4. Biomarcadores de resposta terapêutica

Um biomarcador de resposta terapêutica é usado para mostrar que ocorreu uma resposta biológica num indivíduo exposto a um produto médico ou a um agente ambiental, segundo a FDA e a NHI.

2.3. Características ideais de um biomarcador

Existem certas características universais importantes a qualquer biomarcador (Bennett et Devarajan, 2011; Paul et al., 2019). Idealmente estes devem ser:

- 1) Recolhido de forma não-invasiva, facilmente mensurável, rentável e capaz de produzir resultados rápidos;
- 2) Fácil de quantificar nas fontes prontamente disponíveis como o sangue ou urina;
- 3) Elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a deteção precoce da doença;
- 4) Os níveis dos biomarcadores devem variar rapidamente em resposta ao tratamento;
- 5) Deve auxiliar na estratificação de risco e possuir valor de prognóstico em termos de resultados reais;
- 6) Biologicamente plausível e fornecer informações subjacentes ao mecanismo da doença, como atividade inflamatória, grau de neurodegeneração, desmielinização e remielinização, no caso da Esclerose Múltipla.

Atualmente, são muito poucos os biomarcadores existentes que atendem a todas estas características de um marcador ideal.

2.4. Aplicação dos biomarcadores

Os biomarcadores têm vários tipos de aplicações e contribuem de forma vantajosa para o trabalho dos profissionais de saúde no diagnóstico precoce e na escolha do tratamento ideal para cada doença. Dependendo do tipo de biomarcador, estes servem como meio de avaliação do risco de determinado indivíduo desenvolver uma patologia, podendo de antemão, por exemplo, evitar algum tipo de comportamento de risco. Servem também como diagnóstico diferencial e meio de detecção precoce de inúmeras doenças, tendo um papel fundamental neste campo, a monitorização e seleção da terapêutica ideal e avaliação da recorrência da doença. Por exemplo, são muito utilizados em caso de doença oncológica, avaliação do prognóstico e da ocorrência de metástases em diferentes tipos de neoplasias malignas (Martin, Bielekova, Hohlfeld & Utz, 2006; Bhatt, Mathur, Farooque, Verma & Dwarakanath, 2010).

Assim, os biomarcadores são cada vez mais investigados e constituem uma ferramenta inovadora e de interesse nos dias de hoje.

Para a esclerose múltipla, foram encontrados em fluidos biológicos, sobretudo sangue e LCR, biomarcadores preditivos para ajudar a identificar potenciais indivíduos em risco de desenvolverem EM. Devem ser medidos em pacientes neurologicamente assintomáticos, por exemplo, parentes em primeiro grau de pacientes portadores de EM (Sundström et al., 2004), biomarcadores de diagnóstico que podem servir como método de diagnóstico diferencial, para distinguir os pacientes com EM dos com outros problemas neurológicos auto-imunes ou indivíduos saudáveis, biomarcadores de monitorização da doença que podem ser úteis na distinção das diferentes formas clínicas da EM (Lassmann et al., 2007; Paul et al., 2019) e biomarcadores de resposta terapêutica muito úteis para opções terapêuticas alternativas se necessário (Paul et al., 2019).

3. A Esclerose Múltipla

3.1. Características gerais

A Esclerose Múltipla (EM) é a doença autoimune crónica inflamatória mais comum do sistema nervoso central (SNC), afetando mais de 2 milhões de pessoas em

todo o mundo. Surge principalmente em adultos jovens, nas faixas etárias entre os 20 e os 40 anos e tem uma prevalência superior no sexo feminino, sendo a taxa de incidência cerca de três vezes mais elevada comparativamente ao sexo masculino (Fernandez et al., 2014; Reich, Lucchinetti & Calabresi, 2018).

Caracteriza-se pelo seu carácter progressivo, inflamatório e desmielinizante (ver Fig. 4), que leva à destruição das células produtoras de mielina, os oligodendrócitos, provocando um atraso, ou mesmo bloqueio da transmissão do impulso nervoso nos axónios dos neurónios do SNC, que será responsável por uma cascata de mecanismos associados a neurodegenerescência (Hauser & Oksenberg, 2006; Valado et al., 2017).

A palavra *esclerose* é derivada do grego e significa “endurecimento”, que descreve as lesões que se desenvolvem ao redor dos feixes de axónios, e a esclerose é *múltipla* porque a doença atinge muitos sítios no sistema nervoso ao mesmo tempo (Bear, Connors & Paradiso, 2017).

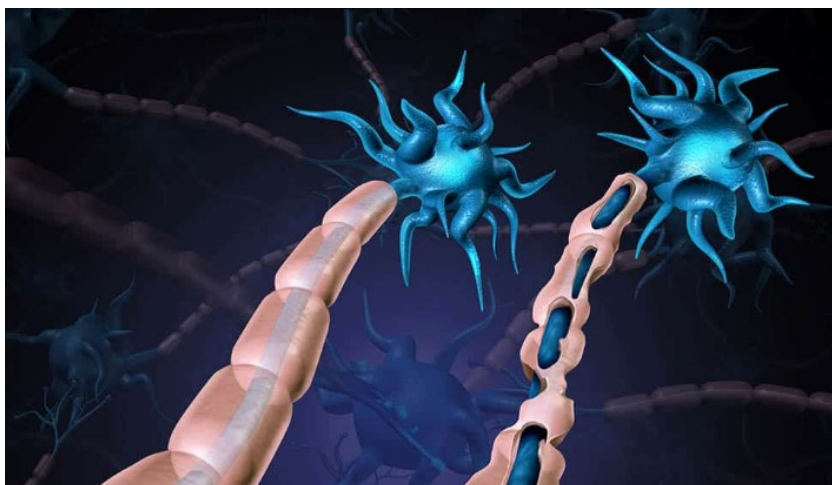


Figura 4 – Neurónio mielinizado e neurónio desmielinizado (imagem disponível em: <https://drauziovarella.uol.com.br/doencas-e-sintomas/esclerose-múltipla/>).

3.2. Fisiopatologia

O sistema nervoso é constituído por dois tipos de células, neurónios e células gliais ou neuróglia. Os corpos celulares dos neurónios e as suas projeções dendritas estão localizados na substância cinzenta do sistema nervoso. O axónio, extensão do corpo celular responsável pela transmissão de mensagens, e que permite estabelecer conexão

morfofuncional via sinapse, é na maior parte dos casos envolvido por mielina, que vai dar um aspeto branco à substância cerebral (Fig. 5) (Bear et al., 2017).

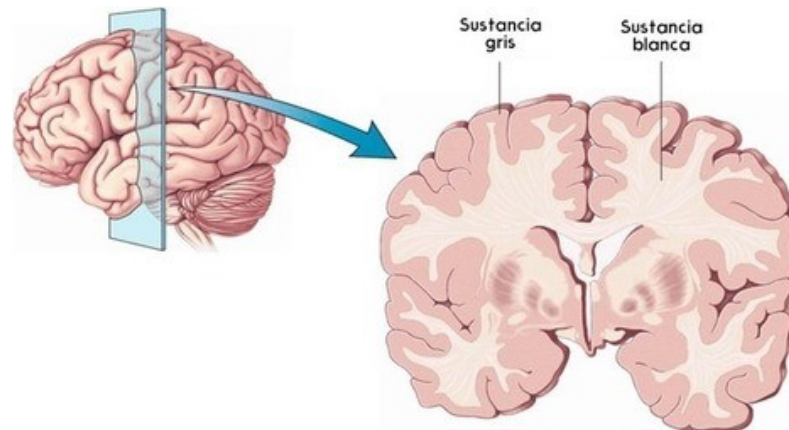


Figura 5 - Esquema da substância branca e substância cinzenta (imagem disponível em: <https://curiosoando.com/que-es-la-sustancia-gris>).

A mielina é uma membrana sintetizada pelos oligodendrócitos no SNC e pelas células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP). O processo de mielinização necessita ainda do papel de outras células, nomeadamente os neurónios e os astrócitos, que participam na maturação dos oligodendrócitos. Os dois tipos de mielina são quimicamente diferentes, mas ambos desempenham a mesma função. A mielina é rica em lípidos (70%) mas contém também 30% de proteínas, sendo algumas específicas. Tem como principal função isolar e proteger o axónio, e aumentar a velocidade de propagação do impulso nervoso. A mielina é interrompida regularmente ao nível de estruturas chamadas os nódulos de Ranvier (ver Fig. 6) que possuem elevadas concentrações de canais de sódio dependentes da voltagem permitindo a transmissão eficiente de um impulso nervoso de maneira saltatória ao longo do axónio.

Na EM, existe uma perda da mielina do SNC. Quando ocorre o processo de desmielinização, existe uma alteração da localização dos canais de sódio dos nódulos de Ranvier como consequente alteração da propagação do impulso nervoso. Ocorre também uma alteração de trocas iónicas que se traduz por uma acumulação de cálcio intracelular responsável por uma cascata de mecanismos ligados à neurodegenerescência (Waxman, 2006).

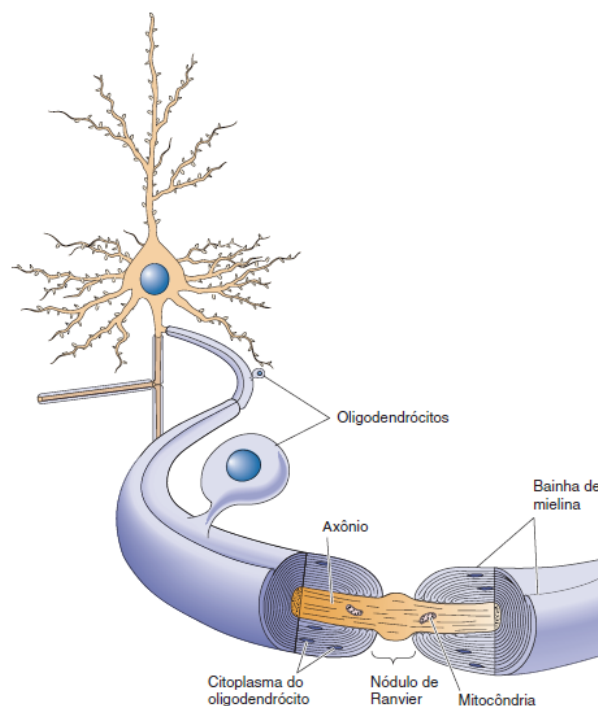


Figura 6 – Esquema detalhado do axônio (adaptado de Bear et al., 2017 , p.52).

Os oligodendrócitos têm funções neurotróficas, isto é, produzem alguns fatores tróficos para os corpos neuronais, sendo também necessários para a aglomeração dos canais de sódio nos nódulos de Ranvier e são precisas para um transporte axonal normal e integridade estrutural dos axônios (Nave & Trapp, 2008; Benarroch, 2009). Pensa-se que estas células possam estar alteradas na EM, dando possivelmente origem à reatividade inflamatória contra a mielina e axônios. São particularmente sensíveis à hipoxia, isquemia e stress oxidativo, o que pode levar a uma alteração na manutenção da mielina, tornando-a mais suscetível ao ataque imunológico e à sua consequente degradação (Henderson, Barnett, Paratt & Prineas, 2009).

O SNC é revestido pelas meninges, onde no seu espaço subaracnoídeo circula o líquido cefalorraquidiano (LCR), pobre em proteínas e células, maioritariamente do tipo linfócitos T (Maggs & Palace, 2004). Para proteger as células do sistema nervoso, os capilares cerebrais apresentam características especiais, constituindo a barreira hematoencefálica (BHE). Uma alteração da permeabilidade desta barreira pode promover a migração de células da circulação sistêmica, nomeadamente dos leucócitos e desencadear uma cascata de eventos levando à danificação/destruição da bainha de mielina e dos próprios oligodendrócitos, produz as tais áreas danificadas ao longo do axônio ou a sua perda, retardando ou interrompendo a condução nervosa e desencadeia

processos inflamatórios e sintomas neurológicos característicos desta doença degenerativa (Frohman, Racke & Raine, 2006) (Fig. 7).

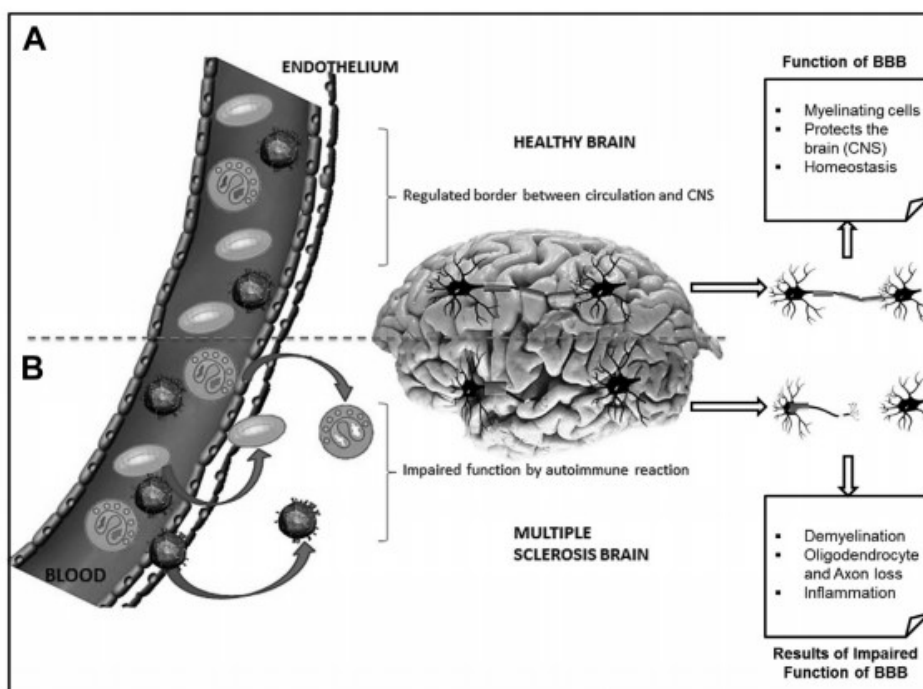


Figura 7- Diferenças entre um cérebro saudável (A) e um cérebro com EM (B). A lesão da barreira hematoencefálica permite a infiltração de células imunitárias, seguida de resposta inflamatória que se traduz por uma desmielinização, perda axonal e neurodegenerescência (adaptado de Ortiz et al., 2014).

3.3. Epidemiologia

A EM é uma doença mais frequente em países de climas temperados, sendo mais comum na Europa e Estados Unidos, cuja prevalência e incidência aumenta com a latitude para Norte e Sul do equador. Por outras palavras, significa que países equatoriais poderão considerar-se de baixo risco, enquanto que nos países a norte e sul desta linha o risco é aumentado (Kurtzke, 1995; Kantarci & Wingerchuk, 2006). A taxa de prevalência é também superior na raça caucasiana comparativamente a outras raças/etnias (Noonan, Kathman & White, 2002).

3.4. Etiologia

Embora esta patologia ainda não esteja totalmente esclarecida e as causas sejam pouco conhecidas, a EM é uma doença complexa e multifatorial, que poderá ser associada à interação entre fatores de risco genético e fatores ambientais como, por exemplo, o déficit de vitamina D ou a infecção pelo vírus do Epstein-Barr (Fig. 8). A Esclerose Múltipla é uma doença muito heterogênea, com uma grande variabilidade de sintomas, podendo ocorrer surtos ou episódios mais graves ao longo da sua progressão (Compston e Coles 2002; Milo & Kahana 2010).

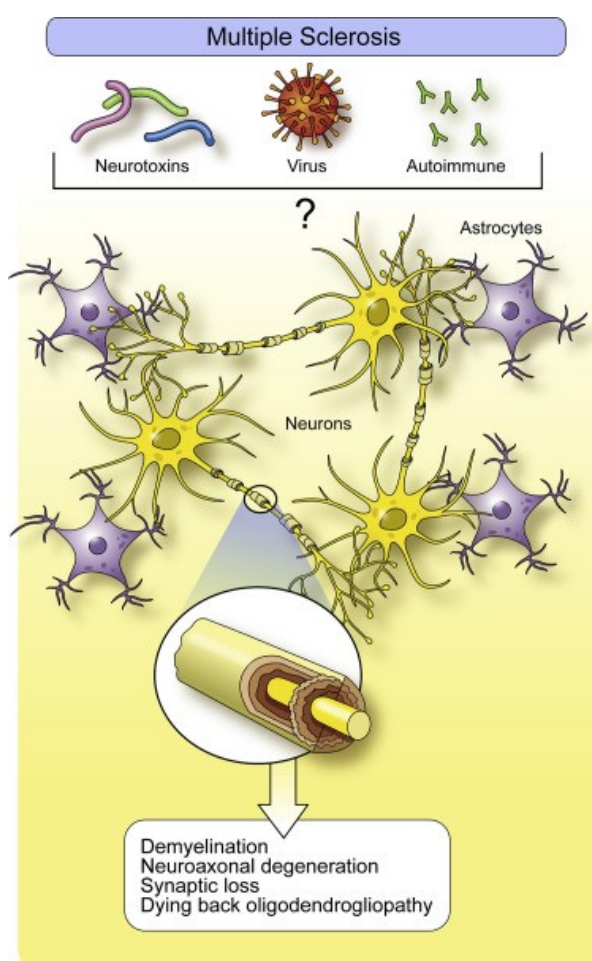


Figura 8 - Possíveis causas da EM (adaptado de Lemus, Warrington & Rodriguez, 2018).

3.5. Sintomas clínicos

Os sintomas da EM incluem perturbações na visão, alterações nos sistemas sensoriais e motores afetando a coordenação e o equilíbrio, disfunção do intestino/bexiga/

órgãos sexuais e do sistema cognitivo (Zuvich, McCauley, Pericak-Vance & Haines, 2009). O papel do médico dentista também é crucial no tratamento destes pacientes pois sintomas como fadiga muscular, espasticidade, fraqueza, tremores, dor facial (neuralgia do trigêmeo) e alterações sensoriais nas mãos (dormência/formigueliro e/ou dor) (Fig.9) (Calabresi, 2004), poderão tornar-se um desafio na higienização adequada da cavidade oral de um paciente portador desta doença neurodegenerativa.

A incapacidade motora e a fadiga também levam muitas vezes a que estes sintam dificuldade no acesso ao consultório e perjurem das consultas de rotina (Fiske, Griffiths & Thompson, 2002; Baird, McGrother, Abrams, Dugmore & Jackson, 2007). É importante também estar atento aos efeitos secundários que a medicação utilizada para a gestão sintomática da EM pode ter a nível da mucosa oral, como a sensação de boca seca (xerostomia) ou outras doenças bucais (Cnossen, 1982; Elemek & Almas, 2013). Assim, o Médico Dentista e o prestador de cuidados desempenham também um papel crucial neste campo.

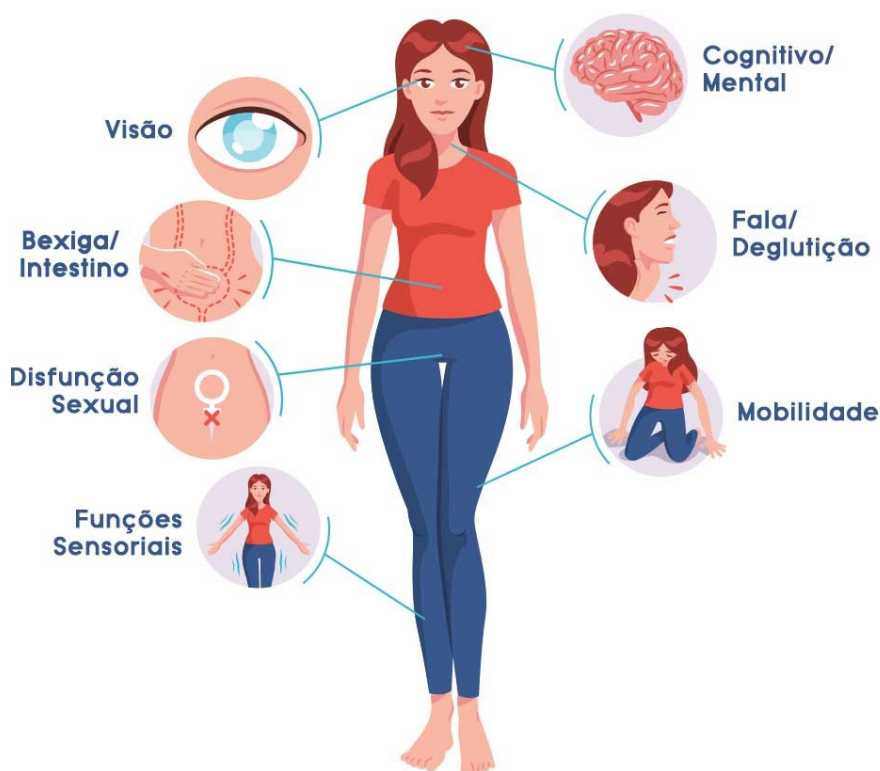


Figura 9 – Órgãos e sistemas do corpo humano afetados na EM (imagem disponível em: <https://www.sanofi.com.br/pt/sua-saude/esclerose-multipla>).

3.6. Curso Clínico

O curso clínico da EM é muito variado e incerto, mas pode geralmente caracterizar-se em quatro subtipos clínicos. A forma clínica surto-remissão (EMSR), caracteriza-se por episódios de ataques agudos de sinais e sintomas neurológicos, denominados como surtos, que podem ser novos ou já recorrentes, seguidos por uma recuperação parcial ou mesmo total. A EM primária progressiva (EMPP), onde existe uma deterioração gradual e contínua do sistema neurológico, sem que ocorram períodos de surtos. Estes doentes sofrem lesões irreversíveis, o que provoca uma progressão lenta e agravamento dos sintomas da doença desde o início. A EM secundária progressiva (EMSP) é o subtipo clínico em que existe uma acumulação progressiva da incapacidade neurológica entre surtos ou mesmo na ausência destes. Estes doentes inicialmente apresentam sintomas reversíveis, mas com o tempo, e por etiologia desconhecida, a degeneração dos axónios provoca lesões irreversíveis, levando a uma incapacidade progressiva. E por fim, a EM progressiva com surtos (EMPS), que é a mais rara das formas clínicas, caracterizada pela incapacidade progressiva desde o início dos sintomas, sendo semelhante à EMPP, mas envolvendo também ataques agudos ou surtos (Lublin & Reingold, 1996; Hauser et al., 2006).

Devido à grande variabilidade clínica da EM, o prognóstico é muito incerto. O tipo, duração, gravidade e impacto dos sintomas variam de indivíduo para indivíduo e algumas pessoas passam longos períodos com poucos ou nenhum sintoma, enquanto outras experimentam problemas mais frequentes ou persistentes (Fernandez et al. 2014).

3.6.1. Terapêutica

A EM é considerada uma doença auto-imune na qual o sistema imunológico ataca os seus próprios tecidos. Atualmente, ainda não existe nenhum tratamento que leve à cura da doença, no entanto, estão disponíveis alguns tratamentos capazes de ajudar na recuperação de ataques/surtos, modificar o curso da doença e atenuar os sintomas.

Segundo a Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica (CNFT), vários fatores devem ser tidos em consideração no momento da escolha entre os diversos fármacos disponíveis, como a forma clínica da doença; comorbilidades e/ou outros tratamentos; a avaliação do perfil de eficácia e segurança de cada fármaco; a atividade diária e preferência de cada doente e monitorização da adesão.

Em Portugal, atualmente estão disponíveis os seguintes tratamentos: formulações de interferão beta, acetato de glatirâmero, natalizumab, alentuzumab, fingolimod, teriflunomida e fumarato de dimetilo. Está também disponível a Fampridina, indicada exclusivamente para administração em doentes adultos com esclerose múltipla que tenham disfunções da marcha (Furtado, 2016).

No sistema de saúde português, os medicamentos para a Esclerose Múltipla são financiados na totalidade pelo Serviço Nacional de Saúde (SNS) e dispensados nas farmácias hospitalares.

3.7. Diagnóstico

O diagnóstico da EM é baseado na história clínica e no exame clínico do doente, complementando-se com achados imagiológicos e testes laboratoriais. Contudo, não existe uma característica clínica ou procedimento de diagnóstico específico para a EM. O diagnóstico deve incluir um exame físico completo realizado por um neurologista experiente que consiga avaliar sinais clínicos de disfunção neurológica. Esta avaliação deve ser acompanhada por vários testes e procedimentos para avaliar a existência de lesões no SNC (Fischer, Epstein & Klasser, 2009). Contudo é importante referir que a heterogeneidade da doença não se limita apenas aos sintomas, mas também à aparência histológica e imagiológica das lesões e à própria resposta às diferentes terapêuticas (Lemus et al., 2018).

Um dos critérios de diagnóstico envolve a disseminação de placas no tempo e no espaço, indicando evidências de múltiplas lesões do SNC e a ocorrência de episódios sintomáticos distintos com pelo menos 30 dias de intervalo (Fischer et al., 2009). Assim, atualmente o diagnóstico da EM baseia-se, principalmente, em técnicas de imagiologia, sendo a Ressonância Magnética (RM) o exame de eleição. Contudo, as lesões objetivadas na RM, mesmo tendo aspetos relativamente típicos de EM, não são específicas, sendo por isso também importante a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) para um correto diagnóstico (Hauser et al., 2006; Fernandez et al., 2014).

3.7.1. Biomarcadores biológicos na Esclerose Múltipla

Atualmente, a aplicação de biomarcadores clínicos e de imagem não é suficientemente precisa e exímia na caracterização e predição individual da doença da EM. Muitos são os estudos neste campo, no entanto muitos são também os desafios na hora de estabelecer um novo biomarcador ideal para a doença (Ziemssen, Akgün & Brück, 2019).

A RM pode ajudar no diagnóstico da EM ao mostrar a morfologia e localização das lesões típicas da doença, mas também a sua evolução no tempo e no espaço e excluir outras patologias. Ela permite determinar o tamanho, número, idade e desenvolvimento das lesões do SNC do paciente desempenhando um papel importantíssimo no diagnóstico e monitorização da terapêutica (Cook et al., 2012). Contudo, um dos grandes problemas que ocorre nesta doença, é que a nível de sintomas/ características das lesões, existe uma enorme discrepância interindividual (Tur et al., 2018).

O dano tecidual na esclerose múltipla resulta de uma interação complexa e dinâmica entre o sistema imunológico, oligodendrócitos ou precursores, microglia e glia, por isso a busca de marcadores desta doença continua a mobilizar muitos grupos de investigação (Reich et al., 2018).

A maior parte dos marcadores para a EM foram avaliados no sangue ou no LCR. Estes fluidos apresentam cada um vantagens e desvantagens como resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Vantagens e Desvantagens da deteção de biomarcadores no sangue e no LCR (adaptado de Ziemssen et al., 2019).

	Vantagens	Desvantagens
Sangue	<ul style="list-style-type: none"> • Colheita segura, rápida e fácil • Possibilidade de ser avaliado em diferentes momentos • Quantidades elevadas podem ser analisadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Não reflete necessariamente as alterações do SNC • Variações diurnas de inúmeros marcadores solúveis • Marcadores afetados por muitos processos (degradação, doenças coexistentes...) • Baixa concentração do potencial biomarcador
Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Melhor espelho do SNC • Concentração baixa do potencial biomarcador 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de punção lumbar • Volume da amostra reduzido • Frequência de recolha limitada

O interesse do estudo do LCR no diagnóstico da EM remonta ao princípio do século XX. Devido ao melhoramento das técnicas analíticas, descobriu-se nos anos 60 que o LCR dos pacientes com EM tinha uma composição proteica diferente do soro. Observou-se que o LCR apresentava bandas oligoclonais (BOC) na região gama aquando duma eletroforese de proteínas, atualmente realizada por focagem isoeletrica. As BOC correspondem às imunoglobulinas que se acumulam em bandas individuais e são observadas no LCR. Elas são formadas sobretudo por imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM) produzidas por células de tipo B no SNC. A existência dessas bandas no LCR, mas não no soro, é um forte indicador da síntese intratecal de anticorpos e é encontrada na maioria dos pacientes com EM clinicamente diagnosticada. A presença destas bandas, normalmente está também associada a um curso da doença mais agressivo (Ferraro et al., 2015). Para avaliar a síntese intratecal de imunoglobulinas, recorre-se à quantificação das imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG) no soro e LCR. A fim de se poder discriminar entre a fração das imunoglobulinas provenientes do sangue, daquela originária do tecido nervoso refletida no LCR, calcula-se diversos quocientes LCR/soro, utilizando diversas fórmulas (Thouvenot, 2018).

Os BOC são detetáveis em mais de 95% dos pacientes com EM no LCR. Contudo, as BOC não são específicas da EM podendo aparecer em outras doenças inflamatórias do SNC. Porém, se outros diagnósticos forem descartados, as BOC são um complemento muito relevante e significativo no diagnóstico de EM (Ziemssen et al., 2019).

Atualmente, elas representam o único biomarcador biológico útil para o diagnóstico de EM progressiva primária (EMPP), embora também estejam presentes em > 90% dos casos de EM surto-remissão (EMSR) (Paul et al., 2018).

A produção intratecal de IgG e mais recentemente a quantificação das suas cadeias κ e λ livres (*free light chain* - FLC) no LCR, com maior ênfase para a κ -FLC, está a ganhar considerável interesse no prognóstico da EM (Lo Sasso, Agnello, Bivona, Bellia & Ciaccio, 2019). Um novo procedimento permitiu a sua análise na saliva de pacientes e distinguir entre uma EM ativa e em remissão (Kaplan, 2018).

Nos dias de hoje, já existem biomarcadores clinicamente relevantes e promissores, no diagnóstico e prognóstico da doença, bem como na avaliação da resposta à terapêutica e risco de efeitos colaterais (Kaunzner, Al-Kawaz & Gauthier, 2017; Leocani, Rocca & Comi, 2016). Idealmente, um biomarcador está presente nos doentes com uma determinada doença, ausente nos pacientes saudáveis ou em pessoas com outras

patologias, ou ao contrário. Quando a doença piora ou se desenvolve, a concentração do biomarcador deverá aumentar ou diminuir (Comabella & Montalban, 2014).

Na tabela 1 dos anexos (Paul et al., 2019), são detalhados os marcadores em via de pesquisa, marcadores validados, e aqueles úteis clinicamente para a EM. Como se pode notar, a primeira classe é de longe a mais extensa. Dentro de cada classe, referidos no ponto 2.2., são referidos os marcadores preditivos da doença (P), marcadores de diagnóstico (D), marcadores da atividade da doença (DA), e de resposta à terapêutica (AL-R, DC-R,F-R; GA-R, IFN-R, MT-R, NZ-R respectivamente Alemtuzumab, Daclizumab, Fingolimod, Glatimarer-acetate, Interferon β , Mitotranxone, Natalizumab-*response marker*).

De forma sucinta, estes marcadores refletem os aspetos etiopatogénicos da doença e podem ser agrupados em:

- Marcadores de inflamação mediados pelo sistema imunitário como as citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, metaloproteínases que induzem o recrutamento de leucócitos da periferia para o SNC, favorecendo o processo inflamatório; presença de anticorpos contra as moléculas da mielina como por exemplo a Anti-MOG (anti-glicoproteína da mielina oligodendrocitária), Anti-MBP (anti-proteína básica da mielina), óxido nítrico e derivados (como referido no ponto 3.7.2.3., o stress oxidativo é implicada na EM), marcadores celulares como por exemplo Treg, CD31/46b, etc.

As moléculas de adesão celular (CAM), quando encontradas no sangue e no LCR, são um forte indicador da existência de uma inflamação no SNC no espectro clínico do SNC da EM. As terapias que interfiram na adesão celular podem ser de grande importância no tratamento desta doença.

A ligação de células T autorreativas circulantes e macrófagos e subsequente migração através das células endoteliais da barreira hematoencefálica é uma etapa essencial no início da inflamação cerebral (Lassmann, 1995; Steinman, 1996). Esta etapa da passagem das células imunes no local da inflamação é mediada por moléculas de adesão (Springer, 1994). No SNC, as células T são expostas ao antígeno que desencadeia a inflamação através de citocinas libertadas durante o imuno-reconhecimento (Olsson, 1992). A alteração das moléculas de adesão e consequente alteração da permeabilidade da BHE promove a entrada de células imunes e a interação com as células cerebrais, provocando danos na mielina e

oligodendrócitos, e consequentemente, a desmielinização (Raine & Cannella, 1992).

- Marcadores da lesão axonal. A destruição do axónio dos neurónios como consequente alteração da excitabilidade do sistema nervoso pode ser avaliado pelas proteínas constituintes do seu citoesqueleto. Este citoesqueleto (Fig.10) é constituído principalmente por microtúbulos, neurofilamentos e microfilamentos indispensáveis para manter a estrutura e forma do axónio, e para o transporte axonal que assegura o transporte bidireccional de substâncias ou organitos celulares entre o corpo celular do neurónio e sua terminação sináptica.

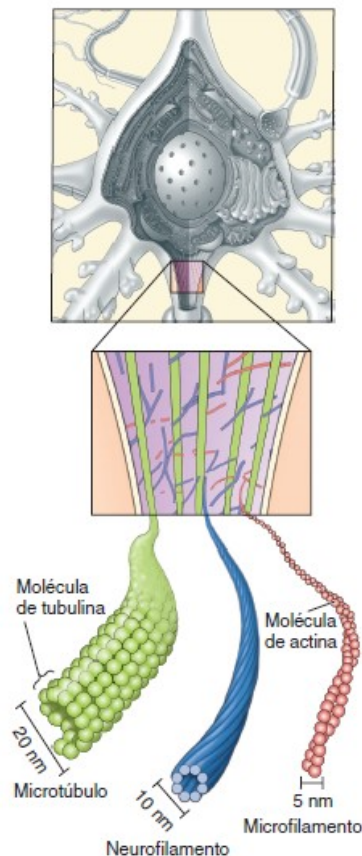


Figura 10 - Componentes do citoesqueleto (adaptado de Bear et al., 2017 ,p.39).

Estas proteínas são indispensáveis à manutenção das propriedades dos neurónios. A presença de anticorpos como a Anti-TUB que indicam uma degradação da tubulina, constituinte dos microtúbulos, e o aumento da proteína Tau que assegura a estabilização destes filamentos, são indicadores da destruição do axónio. Atualmente, um dos marcadores promissores para a EM é a cadeia leve da proteína neurofilamentar (NFL).

Esta é encontrada nos neurofilamentos e tem um papel importante na determinação do diâmetro do axónio e no transporte axonal. Uma lesão do axónio leva a um aumento da sua quantidade no LCR e uma técnica muito sensível chamada SIMOA foi desenvolvida recentemente para a sua medição no sangue. Parece ser um marcador útil nas formas clínicas de surto/remissão e progressivas (Domingues et al., 2017; Berger & Stüve, 2019), mas necessita de mais estudos.

O transporte axonal é um processo ativo, ao que uma perturbação na função mitocondrial na produção de ATP, pode significar uma alteração deste transporte e, consequentemente, um processo neurodegenerativo. O N-acetilaspártato (NAA) é uma das moléculas presentes no cérebro em concentrações mais elevadas e é sintetizada unicamente pelos neurónios. No entanto, o NAA é transferido para os oligodendrócitos, local onde maioritariamente ocorre a sua hidrólise, fornecendo a estes os substratos essenciais para a síntese de mielina. Assim, o NAA acaba por ser um marcador de integridade neuronal, estando em concentrações diminuídas na presença de neurodegeneração, como acontece na EM (Teunissen et al., 2005).

- Marcador de disfunção das células gliais. A GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), proteína associada aos astrócitos, poderá servir como marcador de progressão/severidade da doença na forma progressiva primária (Ahmed et al., 2019).

A chitinase 3 like 1 (CHI3L1) é uma glicosidase secretada por monócitos, microglia e astrócitos ativados nas lesões inflamatórias. O seu papel fisiológico no SNC é desconhecido; no entanto, é considerada uma candidata promissora para o prognóstico da EM.

Em conclusão, existem muitos marcadores, mas ainda não foi possível encontrar marcadores reprodutíveis, sensíveis, específicos e económicos, que possibilitem estabelecer o prognóstico e distinguir as diversas formas da EM em análises de rotina. A investigação continua e com os avanços nos métodos de deteção e quantificação, a saliva é um dos fluidos biológicos estudados como uma boa fonte de amostras para deteção de biomarcadores da EM.

3.7.2 Biomarcadores Salivares na Esclerose Múltipla

Diversos biomarcadores propostos para diagnosticar a EM foram encontrados em fluidos biológicos do corpo humano, como o líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue, lágrimas, urina e saliva (Housley, Pitt & Hafler, 2015).

A saliva é o fluido que apresenta maior relevância para o Médico Dentista. Considerando o aumento da prevalência da EM nos dias de hoje, a necessidade de selecionar o método de diagnóstico mais eficaz, por todas as suas vantagens, torna-se cada vez mais urgente. Embora os estudos neste campo sejam limitados, sabe-se que existem determinados fatores que se encontram alterados na saliva dos pacientes portadores desta doença neurodegenerativa (Saeediborujeni, Schaeffner, Golkar, Salehi & Rashidi, 2018).

3.7.2.1. Imunoglobulina A

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são proteínas que se encontram presentes no soro, na saliva, nas lágrimas, e em vários outros fluidos biológicos. Normalmente, são produzidos em resposta a antígenos - *the anti body generators* (geradores de anticorpos) -, que correspondem a qualquer substância estranha ao corpo.

A imunoglobulina A (IgA) representa apenas 13% dos anticorpos encontrados no soro, no entanto é a principal forma encontrada nas membranas mucosas e nas secreções do corpo, como a saliva, as lágrimas, o muco ou até o leite materno. Face a isto, poderá ser considerada uma das imunoglobulinas mais abundantes no corpo humano. A forma circulante da IgA no plasma, está presente na forma monomérica, mas a forma mais eficaz da IgA, baseia-se em dois monómeros unidos, formando um dímero, que corresponde à IgA secretora, produzida na saliva por plasmócitos que revestem as mucosas. A sua função consiste em impedir que os patógenos (agentes causadores de doença) microbianos, se fixem na mucosa (Tortora, Case & Funke, 2016).

Em 1989, estudos provaram que a forma monomérica da IgA pode ser detetada na saliva de pacientes com EM, embora não seja detetada rotineiramente em indivíduos saudáveis (Coyle, 1989).

3.7.2.2. Sistema de Antígeno Leucocitário Humano, Classe II

O sistema de antígeno leucocitário humano (HLA), denominado *Major Complex Histocompatibility* (MHC) nos seres humanos, são moléculas de proteínas expressas na superfície de leucócitos humanos. O HLA pode ser agrupado em duas classes: HLA classe I e HLA classe II. As moléculas do HLA estão maioritariamente ligadas à superfície celular, mas uma quantidade pequena existe também na forma solúvel no soro, plasma e outros fluidos corporais (Ganapathy, Vedam, Rajeev & Arunachalam, 2017).

Verificou-se que a quantidade média de HLA solúvel classe II (sHLA-II) se encontrava aumentada na saliva dos pacientes com EM (Fig.11). Este aumento de sHLA-II salivar foi associado ao aumento do nível de sHLA-II no LCR, que atualmente é altamente aceite como um meio de avaliar a atividade da doença na EM. Assim, a concentração salivar de sHLA-II poderá funcionar como uma ferramenta de diagnóstico não invasiva, usada para indicar a atividade de doença (Adamashvili, Minagar, Gonzalez-Toledo, Featherston & Kelley, 2005).

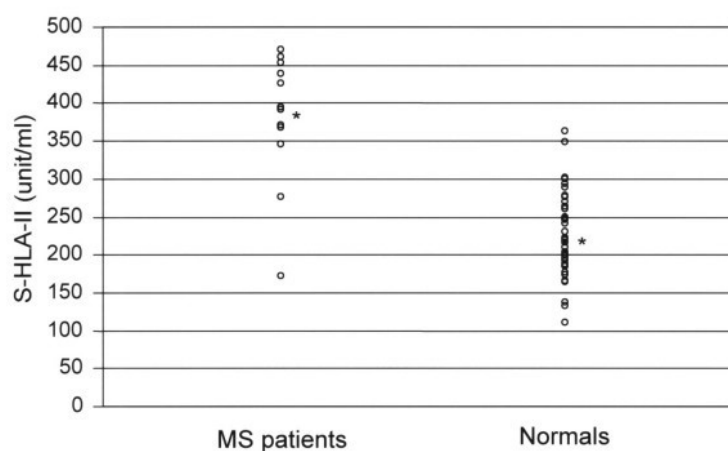


Figura 11- Comparação entre os níveis de HLA classe II solúvel na saliva de pacientes com EM e pacientes saudáveis (adaptado de Adamashvili et al., 2005).

3.7.2.3. Produtos do Stress Oxidativo

O oxigénio (O_2) é necessário para a sobrevivência e produção de energia nas células eucariotas. Em condições fisiológicas, a respiração aeróbia dá-se na mitocôndria, onde o oxigénio funciona como um aceitador de eletrões, o que consequentemente leva à formação do radical livre superóxido, que poderá posteriormente ser convertido noutras

espécies reativas de oxigénio (ERO). O metabolismo celular pode também originar outro tipo de radicais livres a partir do azoto, designados por espécies reativas de azoto (ERA) (Li, Li, Jiang & Ghanbari, 2013). No nosso organismo existem sistemas antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, cujo objetivo é manter os níveis de ERO dentro de valores seguros para as células.

Estas substâncias geralmente são libertadas durante uma resposta inflamatória. Quando formadas em situações basais pelo metabolismo celular, são capazes, devido à sua elevada reatividade, de modificar a maioria das moléculas biológicas, colocando em risco a funcionalidade e a viabilidade celular (Ferreira, Ferreira & Duarte, 2007).

O stress oxidativo (SO) caracteriza-se por um desequilíbrio considerável entre os níveis de oxidantes, ERO e ERA, e a produção de antioxidantes, provocando alterações celulares e podendo levar à degeneração destas células (Robinson, Baumgardner & Otto, 2011). O SO é um fator inerente ao processo de envelhecimento e encontra-se ainda mais elevado quando associado a doenças neurodegenerativas. A perturbação do metabolismo redução-oxidação foi observada e desempenha um papel crucial na patogénese da EM.

A produção de SO ocorre em células de todos os tipos de tecidos, contudo, as células do sistema nervoso central (sobretudo os neurónios) são particularmente suscetíveis ao efeito nocivo do SO, porque são ricas em mitocôndrias (principal local de produção e ação de ERO/ERA), consomem muito O₂, têm um alto teor de ácidos gordos facilmente oxidáveis e possuem enzimas antioxidantes menos eficazes. Demais, os neurónios são consideradas células incapazes de regenerar, limitando a sua substituição e recuperação do tecido nervoso (Li et al., 2013; Niedzielska et al., 2015).

As reações inflamatórias e autoimunes são uma parte importante da EM e os radicais livres são formados por disfunção mitocondrial, pela microglia e ativação dos macrófagos (Ortiz et al., 2014).

Sabe-se que o dano oxidativo tem como alvo as membranas lipídicas, proteínas, mielina, macrófagos, astrócitos e oligodendrócitos e inibem a expressão genética essencial para o processo de mielinização. As espécies de radicais de oxigénio também contribuem para a formação de placas patológicas na EM (Van Horssen, Witte, Schreibelt & De Vries, 2011; Wang, Xie, Wang & Bi, 2014).

No estudo de Martin Karlik, em 2014, foram encontrados marcadores de stress oxidativo em quantidades elevadas no plasma, comprovando o que já tinha sido afirmado em estudos anteriores, de que o stress oxidativo estava envolvido nos processos de

desmielinização e na degeneração axonal na patogénese da EM. No entanto, neste estudo verificou-se que estes valores estavam também aumentados na saliva, tornando a saliva um fluido relevante no diagnóstico desta patologia. Os marcadores de SO podem ser encontrados no soro e na saliva, o que pode revelar doenças locais e sistémicas e pode ajudar no diagnóstico, prognóstico e tratamento de várias doenças.

CONCLUSÃO

Como foi possível constatar ao longo desta revisão, a Esclerose Múltipla é uma patologia muito complexa e heterogênea, sendo um constante e grande desafio para a investigação médica básica e clínica. Não existe cura, mas o diagnóstico precoce pode dar qualidade de vida e permitir selecionar a terapêutica mais adequada para cada indivíduo.

A saliva representa um fluido interessante e com forte potencial a nível de meio de diagnóstico das doenças neurodegenerativas, nomeadamente a EM, devido às inúmeras vantagens, desde o conforto e fácil obtenção, ao baixo custo, tudo características bastante persuasivas tanto para o paciente, como para o profissional de saúde. No entanto, ainda não há estudos suficientes que ofereçam evidência neste campo.

O diagnóstico desta doença neurodegenerativa passa também pelo diagnóstico diferencial de outras doenças neuroinflamatórias, mas em suma, a neurodegeneração é avaliada pela ressonância magnética e pelo quadro clínico do paciente. Contudo, esta avaliação não é suficientemente rigorosa, havendo a necessidade de novos biomarcadores. Inúmeros biomarcadores têm sido estudados, contudo o processo de validação destes é bastante longo.

Nos dias de hoje, é, ainda, um tema onde existe muita incógnita, contradições e incertezas. O desenvolvimento de novos estudos é crucial de forma a melhor responder às questões de uma doença que afeta cada vez mais pessoas, sobretudo jovens.

Quando me propus a fazer este trabalho, acreditava que hoje, no século XXI, fosse algo bastante mais desenvolvido, contudo fui surpreendida pela escassez de resultados promissores. No entanto, os poucos estudos devem encorajar os investigadores a pesquisar na saliva marcadores para o diagnóstico precoce e menos invasivo para monitorizar não só esta doença, mas também as outras doenças neurodegenerativas que são cada vez mais frequentes na população.

BIBLIOGRAFIA

Abdelhak, A., Hottenrott, T., Morenas-Rodríguez, E., Suárez-Calvet, M., Zettl, U. K., Haass, C., Meuth, S. G., Rauer, S., Otto, M., Tumani, H., & Huss, A. (2019). Glial Activation Markers in CSF and Serum From Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Potential of Serum GFAP as Disease Severity Marker?. *Frontiers in neurology*, 10, 280. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00280>

Adamashvili, I., Minagar, A., Gonzalez-Toledo, E., Featherston, L., & Kelley, R. E. (2005). Soluble HLA measurement in saliva and cerebrospinal fluid in Caucasian patients with multiple sclerosis: a preliminary study. *Journal of neuroinflammation*, 2, 13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-13>.

Ahmadi-Motamayel, Fatemeh & Davoodi, Poorandokht & Dalband, Mohsen & Hendi, S.S.. (2010). Saliva as a mirror of the body health. *DJH*. 1. 1-15.

Awad, A., Hemmer, B., Hartung, H. P., Kieseier, B., Bennett, J. L., & Stuve, O. (2010). Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 219(1-2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.09.002>.

Baird, W. O., McGrother, C., Abrams, K. R., Dugmore, C., & Jackson, R. J. (2007). Verifiable CPD paper: factors that influence the dental attendance pattern and maintenance of oral health for people with multiple sclerosis. *British dental journal*, 202(1), E4–41. <https://doi.org/10.1038/bdj.2006.125>

Bear. M. F., Connors B. W. & Paradiso M. A. (2017). *Neurociencias: Desvendando o Sistema Nervoso 4ª edição* (pp. 39-52). Artmed Editora

Benarroch E. E. (2009). Oligodendrocytes: Susceptibility to injury and involvement in neurologic disease. *Neurology*, 72(20), 1779–1785. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181a6b123>

Bennett, Michael & Devarajan, Prasad. (2011). Chapter 1. Characteristics of an Ideal Biomarker of Kidney Diseases. *Biomarkers of Kidney Disease*. 1-24. 10.1016/B978-0-12-375672-5.10001-5.

Berger, T., & Stüve, O. (2019). Neurofilament light chain: An important step toward a disease biomarker in multiple sclerosis. *Neurology*, 92(10), 451–452. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007022>

Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2005;115:1449e57.

Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., & Dwarakanath, B. S. (2010). Cancer biomarkers - current perspectives. *The Indian Journal of Medical Research*, 132(August), 129–149.

Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 2004;10:S2e9

Buczko P, Zalewska A, Szarmach I. Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *J Physiol Pharmacol* 2015;66:3–9

Calabresi PA. Diagnosis and management of multiple sclerosis. *Am Fam Physician* 2004;70:1935-44.

Cnossen M. W. (1982). Considerations in the dental treatment of patients with multiple sclerosis. *Journal of oral medicine*, 37(2), 62–64.

Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2014;13:113–26.

Compston, A. and A. Coles (2002). "Multiple sclerosis." *The Lancet* **359**(9313): 1221-1231

Cook SD, Dhib-Jalbut S, Dowling P, Durelli L, Ford C, Giovannoni G, et al. Use of Magnetic Resonance Imaging as Well as Clinical Disease Activity in the Clinical Classification of Multiple Sclerosis and Assessment of Its Course. *Int J Ms Care*. 2012;14:105–14

Coyle P. Molecular analysis of IgA in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1989;22(2):83-92.

de Almeida, P., Grégio, A. M., Machado, M. A., de Lima, A. A., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The journal of contemporary dental practice*, 9(3), 72–80.

DeKosky ST, Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 2003;302:830e4.

Domingues, R. B., Fernandes, G., Leite, F., & Senne, C. (2019). Neurofilament light chain in the assessment of patients with multiple sclerosis. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 77(6), 436–441. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190060>

Domingues, R. B., Fernandes, G., Leite, F., Tilbery, C. P., Thomaz, R. B., Silva, G. S., Manguiera, C., & Soares, C. (2017). The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(1), 100–104. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RW3706>

Ekström, J, Hylén N, Castagnola M & Messana I. (2012). Saliva and the control of its secretions. In: Ekber, J. (Ed.). *Dysphagia: Diagnosis and Treatment*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 19-47

Elemek, E., & Almas, K. (2013). Multiple sclerosis and oral health: an update. *The New York state dental journal*, 79(3), 16–21

Evans RW. Complications of lumbar puncture. *Neurol Clin* 1998;16:83e105.

Farah R, Haraty H, Salame Z, Fares Y, Ojcius DM, Said Sadier N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. *Biomed J*. 2018;41(2):63-87. doi:10.1016/j.bj.2018.03.004

FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016-. Diagnostic Biomarker. 2016 Dec 22. Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD)

Fernandez, O., Martin, R., Rovira, A., Llufríu, S., Vidal-Jordana, A., Fernandez-Sanchez, V. E., Alvarez-Cermeno, J. C., Izquierdo, G., Arroyo-Gonzalez, R., Rodriguez-Antigüedad, A., Casanova-Estruch, B., & Montalbán, X. (2014). Biomarkers in multiple sclerosis: an update for 2014. *Revista de neurologia*, 58(12), 553–570

Ferraro, D., Galli, V., Vitetta, F., Simone, A. M., Bedin, R., Del Giovane, C., Morselli, F., Filippini, M. M., Nichelli, P. F., & Sola, P. (2015). Cerebrospinal fluid CXCL13 in clinically isolated syndrome patients: Association with oligoclonal IgM bands and prediction of Multiple Sclerosis diagnosis. *Journal of neuroimmunology*, 283, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.04.011>

Ferreira, Filipe, Ferreira, Rita, & Duarte, José Alberto. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 7(2), 257-275. Recuperado em 06 de agosto de 2020, de http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1645-05232007000200014&lng=pt&tlng=pt

Fischer DJ, Epstein JB, Klasser G. Multiple sclerosis: an update for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(3):318-327. doi:10.1016/j.tripleo.2009.05.047

Fiske J, Griffiths J, Thompson S. Multiple sclerosis and oral care. *Dent Update*. 2002;29:273-283. 15.

Fiske, J., Griffiths, J., & Thompson, S. (2002). Multiple sclerosis and oral care. *Dental update*, 29(6), 273–283. <https://doi.org/10.12968/denu.2002.29.6.273>

Forde, M. D., Koka, S., Eckert, S. E., Carr, A. B., & Wong, D. T. (2006). Systemic assessments utilizing saliva: part 1 general considerations and current assessments. *The International journal of prosthodontics*, 19(1), 43–52.

Frohman, E. M., Racke, M. K., & Raine, C. S. (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine*, 354(9), 942–955. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052130>

Furtado C., (2016). Esclerose Múltipla Utilização de Novos Medicamentos em Portugal. *Infarmed*

Ganapathy S, Vedam V, Rajeev V, Arunachalam R. Autoimmune Disorders–Immunopathogenesis and Potential Therapies. *J Young Pharm* 2017;9(1):14- 22.

Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc* 2008;139(Suppl 5):25S–34S

Gasser T. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology*. 2009;72(7 Suppl):S27-S31. doi:10.1212/WNL.0b013e318198e054

Gerard J. Tortora, Christine L. Case, Berdell R. Funke. (2016). *Microbiologia - 12ª Edição*. Artmed Editora

Haeckel, R., & Hänecke, P. (1996). Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(3), 171–191.

Harris, V. K., Tuddenham, J. F., & Sadiq, S. A. (2017). Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. *Degenerative neurological and neuromuscular disease*, 7, 19–29. <https://doi.org/10.2147/DNND.S98936>

Hauser, S. L. and J. R. Oksenberg (2006). "The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration." *Neuron* **52**(1): 61-76.

Henderson APD, Barnett MH, Paratt JDE, Prineas JW. (2009) Multiple Sclerosis. Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann.Neurol*.66:739-753.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent* 2003;28:47–52

Holland R L, 2016, What makes a good biomarker? *Advances in Precision Medicine*, vol.1(1): 4–11

Housley, W. J., Pitt, D., & Hafler, D. A. (2015). Biomarkers in multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 161(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.06.015>

Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>

Jankowska, A. K., Waszkiel, D., & Kowalczyk, A. (2007). Slina jako główny składnik ekosystemu jamy ustnej. Cześć I. Mechanizm wydzielania i funkcje [Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. Part I. Secretion and function]. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, 60(3-4), 148–154.

Kantarci, O. and D. Wingerchuk (2006). "Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights." *Current Opinion in Neurology* **19**(3): 248-254

Karlík, M., Valkovič, P., Hančinová, V., Krížová, L., Tóthová, Ľ., & Celec, P. (2015). Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. *Clinical biochemistry*, 48(1-2), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.023>

Kaunzner UW, Al-Kawaz M, Gauthier SA. Defining Disease Activity and Response to Therapy in MS. *Curr Treat Option Ne*. 2017;19:20.

Kurtzke, J. F. (1995). "Ms Epidemiology World Wide - One View of Current Status." *Acta Neurologica Scandinavica* 91: 23-33.

Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ Health Perspect* 2005;113:1230e3.

Lassmann HVass K Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of its lesions? *Springer Semin Immunopathol*. 1995;1777- 87

Lassmann, H., Brück, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(2), 210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x>.

Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12(3):206-211. doi:10.1111/j.1601-6343.2009.01454.x

Lee, Y. & Wong, D. T. (2010). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases, 22(4), 241–248

Lemus, H. N., Warrington, A. E., & Rodriguez, M. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurologic clinics*, 36(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.08.002>

Leocani L, Rocca MA, Comi G. MRI and neurophysiological measures to predict course, disability and treatment response in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2016;29:243

Lesko LJ, Atkinson AJ Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:347-366. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.347

Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences.* 2013;14(12):24438-75.

Lima DP, Diniz DG, Moimaz SAS, Sumida DH, Okamoto AC. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis* 2009

Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol* 2012;48:569–77

Lo Sasso, B., Agnello, L., Bivona, G., Bellia, C., & Ciaccio, M. (2019). Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis Diagnosis: An Update. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(6), 245. <https://doi.org/10.3390/medicina55060245>

Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." *Neurology* 46(4): 907-911.

Maggs FG e Palace J. (2004). The pathogenesis of multiple sclerosis: is it a really primary inflammatory process?. *Mult.Sclerosis* 10: 326-29.

Maiese K. (2009). Marking the onset of oxidative stress: biomarkers and novel strategies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.1.8059>

Malathi N, Mythili S, Vasanthi HR. Salivary diagnostics: a brief review. *ISRN Dent.* 2014;2014:158786. Published 2014 Jan 29. doi:10.1155/2014/158786

Malon, R. S. P., Sadir, S., Balakrishnan, M., & Córcoles, E. P. (2014). Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. *BioMed Research International*, 2014(i), 1–20. <http://doi.org/10.1155/2014/962903>

Martí-álamo, S., Mancheño-franch, A., Marzal-gamarra, C., & Carlos-fabuel, L. (2012). Saliva as a diagnostic fluid . Literature review, 4(4). <http://doi.org/10.4317/jced.50865>

Martin, R., Bielekova, B., Hohlfeld, R., & Utz, U. (2006). Biomarkers in multiple sclerosis. *Disease markers*, 22(4), 183–185. <https://doi.org/10.1155/2006/508354>

Meinl, E., M. Krumbholz and R. Hohlfeld (2006). "B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation." *Ann Neurol* **59**(6): 880-892.

Mese, H., & Matsuo, R. (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of oral rehabilitation*, 34(10), 711–723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2007.01794.x>

Mikkonen, J. J., Singh, S. P., Herrala, M., Lappalainen, R., Myllymaa, S., & Kullaa, A. M. (2016). Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *Journal of periodontal research*, 51(4), 431–437. <https://doi.org/10.1111/jre.12327>

Milo, R., & Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews*, 9(5), A387–A394. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.010>

Mirzaii-Dizgah, M. H., Mirzaii-Dizgah, M. R., & Mirzaii-Dizgah, I. (2020). Serum and saliva total tau protein as a marker for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Medical hypotheses*, 135, 109476. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109476>

Nave, K. A., & Trapp, B. D. (2008). Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annual review of neuroscience*, 31, 535–561. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309>.

Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., & Filip, M. (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*, 53(6), 4094–4125. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>

Noonan, C. W., Kathman, S. J., & White, M. C. (2002). Prevalence estimates for MS in the United States and evidence of an increasing trend for women. *Neurology*, 58(1), 136–138. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.1.136>

Olsson T. (1992). Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *Journal of neuroimmunology*, 40(2-3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(92\)90135-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(92)90135-8)

Ortiz, G. G., Pacheco-Moisés, F. P., Macías-Islas, M. Á., Flores-Alvarado, L. J., Mireles-Ramírez, M. A., González-Renovato, E. D., Hernández-Navarro, V. E., Sánchez-López, A. L., & Alatorre-Jiménez, M. A. (2014). Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Archives of medical research*, 45(8), 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.013>.

Pachner, A. R., DiSano, K., Royce, D. B., & Gilli, F. (2018). Clinical utility of a molecular signature in inflammatory demyelinating disease. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 6(1), e520. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000520>

Pandey, A.. Physiology of Saliva: An Overview. **Journal of Dentistry Indonesia**, North America, 21, sep. 2014. Available at: <http://www.jdentistry.ui.ac.id/index.php/JDI/article/view/186>.

Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(3):a029058. Published 2019 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a029058

Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical chemistry*, 57(5), 675–687. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>

Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., & Indrak, K. (2009). Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 153(2), 103–110. <https://doi.org/10.5507/bp.2009.017>

Raine CS, Cannella B. (1992) Adhesion molecules and central nervous system inflammation. *Semin Neurosci*; 4201- 211. [https://doi.org/10.1016/1044-5765\(92\)90003-K](https://doi.org/10.1016/1044-5765(92)90003-K)

Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P., & Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*, 3(7), 569–581. <https://doi.org/10.1038/nri1130>

Reale M, Gonzales-Portillo I, Borlongan CV. Saliva, an easily accessible fluid as diagnostic tool and potent stem cell source for Alzheimer's Disease: Present and future applications. *Brain Res*. 2020;1727:146535. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146535>

Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 378(2), 169–180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>

Robinson, M. A., Baumgardner, J. E., & Otto, C. M. (2011). Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Free radical biology & medicine*, 51(11), 1952–1965. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.034>

Saeediborujeni MJ, Schaeffner E, Golkar SH, Salehi M, Rashidi B. The Survey of Saliva Compositional Alterations is a Non-invasive Method in Determining of Multiple Sclerosis Progression in Children. *Iran J Child Neurol. Winter* 2018;12(1):109-11

Sahu, P., Pinkalwar, N., Dubey, R., Paroha, S., Chatterjee, S., & Chatterjee, T. (2011). Biomarkers: An Emerging Tool for Diagnosis of a Disease and Drug Development. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 9–16

Segal, A., & Wong, D. T. (2008). Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *European journal of dental education : official journal of the Association for Dental Education in Europe*, 12 Suppl 1(Suppl 1), 22–29. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2007.00477.x>

Shi, M., Caudle, W. M., & Zhang, J. (2009). Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiology of disease*, 35(2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.09.004>

Springer T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2), 301–314. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90337-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9)

Steinman L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 85(3), 299–302. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81107-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81107-1)

Sundström, P., Juto, P., Wadell, G., Hallmans, G., Svenningsson, A., Nyström, L., Dillner, J., & Forsgren, L. (2004). An altered immune response to Epstein-Barr virus

in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*, 62(12), 2277–2282.

<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000130496.51156.d7>

Teunissen, C. E., Dijkstra, C., & Polman, C. (2005). Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 4(1), 32–41. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00964-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00964-0)

Thouvenot E. (2018). Multiple sclerosis biomarkers: Helping the diagnosis?. *Revue neurologique*, 174(6), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.04.002>

Tur, C., Moccia, M., Barkhof, F., Chataway, J., Sastre-Garriga, J., Thompson, A. J., & Ciccarelli, O. (2018). Assessing treatment outcomes in multiple sclerosis trials and in the clinical setting. *Nature reviews. Neurology*, 14(2), 75–93. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.171>

Valado, A., Leitão, M. J., Martinho, A., Pascoal, R., Cerqueira, J., Correia, I., Batista, S., Sousa, L., & Baldeiras, I. (2017). Multiple sclerosis: Association of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with risk and clinical course the disease. *Multiple sclerosis and related disorders*, 11, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.12.003>

van Horssen, J., Witte, M. E., Schreibelt, G., & de Vries, H. E. (2011). Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.011>

Walsh, N. P., Laing, S. J., Oliver, S. J., Montague, J. C., Walters, R., & Bilzon, J. L. (2004). Saliva parameters as potential indices of hydration status during acute dehydration. *Medicine and science in sports and exercise*, 36(9), 1535–1542. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000139797.26760.06>

Wang, P., Xie, K., Wang, C., & Bi, J. (2014). Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in

multiple sclerosis. *European neurology*, 72(3-4), 249–254.
<https://doi.org/10.1159/000363515>

Waxman S. G. (2006). Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(12), 932–941.
<https://doi.org/10.1038/nrn2023>

Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. (2013). Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021>

Zhang, Y., Sun, J., Lin, C. C., Abemayor, E., Wang, M. B., & Wong, D. T. (2016). The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontology 2000*, 70(1), 38–52.
<https://doi.org/10.1111/prd.12099>

Ziemssen, T., Akgün, K., & Brück, W. (2019). Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1674-2>

Zuvich, R. L., McCauley, J. L., Pericak-Vance, M. A., & Haines, J. L. (2009). Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Seminars in immunology*, 21(6), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.08.003>

Anexos

Tabela 1 - Lista de biomarcadores moleculares na EM (adaptado de Paul et al, 2018).

Table 1. Comprehensive list and strength of evidence for molecular biomarkers in multiple sclerosis

Exploratory biomarkers	Validated biomarkers	Clinically useful biomarkers
Cytokines (D, DA, IFN- β -R, GA-R)	Anti-EBNA (P, D, DA)	Anti-NZ (NZ-R)
Adhesion molecules (D, DA, IFN- β -R, NZ-R)	KFLC (D)	NAbs (IFN- β -R)
Chemokines and receptors (D, DA, IFN- β -R)	IGM OB (D, DA, IFN- β -R, NZ-R)	IgG OB (D)
MMPs and inhibitors (D, DA, IFN- β -R)	NCAM1 (D, DA)	IgG index (D)
Proteomics (D, DA, IFN- β -R)	NO metabolites (D, DA)	Anti-AQP4 (D)
Cystatin C (D)	MMP9 (D, DA, IFN- β -R)	Anti-JC virus (NZ-R)
microRNA (D, DA, GA-R)	MBP (D, DA)	Anti-VZV (F-R)
C31/C4b (D, DA)	MMP9 (D, DA, IFN- β -R)	
sCD146 (DA)	MBP (D, DA)	
sCD14 (D, DA)	SPP1 (D, DA)	
sHLA I and sHLA II (D, DA, IFN- β -R)	CXCL13 (D, DA)	
sHLA-G (D)	GFAP (D, DA)	
sNogo-A (D, DA)	BDNF (D, DA, IFN- β -R, GA-R)	
Anti-Nogo-A (D, DA)	KCNJ10 (D)	
Anti-MBP (D, DA)	MRZ reaction (D, DA)	
Anti-MOG (D, DA)	CHI3L1 (D, DA, NZ-R)	
Anti-HHV6 (DA)	Complement factor H (DA)	
Anti-proteasome (D)	Type I IFNs (DA, IFN- β -R)	
Anti-CD46 and anti-CD59 (DA)	GPC5 (IFN- β -R)	
Lipocalin 2 (DA)	HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB*04:08 (IFN- β -R)	
VEGFA (DA)	IL-17 (D, DA)	
AMCase and Chit (D,DA)	BAFF (D, DA, IFN- β -R)	
Fetuin-A (D, DA, NZ-R)	TNF, IL-12, IL-23 (D, DA)	
APRIL (DA)	GWAS genes (P, D)	
CSF cells (D, DA)	NEFH (DA)	
S/GPL (P, D)	NEFL (D, DA, NZ-R)	
HMGB1 (D)	25(OH) vit D (P, D, DA, IFN- β -R)	
TOB1 (D)	CD56 ^{bright} NK cells (DC-R, IFN- β -R)	
S100B and ferritin (D, DA)		
Isoprostanes (P, D, DA)		
Oxysterols (D, DA)		
Pentosidine (D, DA)		
Tau (D, DA)		
14-3-3 (D, DA)		
NAA and NSE (D, DA)		
Anti-Tub and b-Tub (D, DA)		
Anti-NEFL (DA)		
Neurotrophic factor (D, DA)		
Tregs (DA)		
KCNK5 (D, DA)		
FGF2 and PDGF-AA (DA)		
gMS classifier 1 (D, DA)		
Myeloid MVs (D, DA)		
sAPP, A β peptides (D, DA)		
Apoptosis-related molecules (D, DA, IFN- β -R)		
Cosignaling molecules (DA, IFN- β -R)		
GWAS genes (IFN- β -R)		
Candidate genes (IFN- β -R, GA-R)		

CIITA (IFN- β -R)
APLA (IFN- β -R)
IL-17F (IFN- β -R)
ABCB1, ABCG2 (MT-R)
IL-21 (AL-R)

P, Predictive biomarker; D, diagnostic biomarker; DA, disease activity biomarker; AL-R, alemtuzumab-response biomarker; DC-R, daclizumab-response biomarker; F-R, fingolimod-response biomarker; GA-R, glatiramer-acetate-response biomarker; IFN- β -R, interferon β response biomarker; MT-R, mitoxantrone-response biomarker; NZ-R, natalizumab-response biomarker; MMP, matrix metalloprotease; C3/C4b, complement components C3 and C4b; sCD146, soluble CD146; sCD14, soluble CD14; sHLA, soluble human leukocyte antigen; sHLA-G, soluble HLA-G; sNogo-A, soluble Nogo-A; anti-Nogo-A, anti-Nogo-A antibodies; anti-MBP, anti-myelin basic protein; anti-MOG, anti-myelin oligodendrocyte protein; anti-HHV-6, anti-human herpesvirus 6; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; AMCase, acid mammalian chitinase; Chit, chitinase 1(chitotriosidase); TNFSF13 (also known as APRIL), tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13; S/GPL, sulphatide and glycosphingolipid antibody titers; HMGB1, high mobility group box 1; TOB1, transducer of ERBB2 1; NAA, N-acetyl aspartic acid; NSE, neuron-specific enolase; anti-Tub, anti-tubulin antibodies; β -Tub, β -tubulin isoforms II and III; anti-NEFL, anti-neurofilament light chain antibodies; Tregs, T-regulatory cells; KCNK5, potassium channel subfamily K member 5; FGF2, fibroblast growth factor 2; PDGF-AA, platelet-derived growth factor-AA; gMS classifier 1, anti-Glc(α 1,4) Glc(α) IgM antibodies; myeloid MVs, myeloid microvesicles; sAPP, soluble amyloid precursor protein; A β peptide, amyloid β peptide; GWAS, genome-wide association study; CIITA, class II transactivator; APLA, antiphospholipid antibodies; ABCB1, ATP-binding cassette, subfamily B, member 1; ABCG2, ATP-binding cassette, subfamily G, member 2; anti-EBNA, antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigens; KFLC, κ -free light chain; OB, oligoclonal bands; NCAM1, neural cell adhesion molecule 1; NO metabolites, nitric oxide and its metabolites, nitrates, and nitrites; SPP1 (also known as osteopontin), secreted phosphoprotein 1; CXCL, CXC ligand 1; GFAP, glial fibrillary acidic protein; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; KCNJ10 (also known as KIR4.1), potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 10; MRZ reaction, intrathecal humoral immune response against measles, rubella, and varicella zoster virus; CHI3L1, chitinase-3-like protein 1; GPC5, glypican-5; BAFF, B-cell activating factor; TNF, tumor necrosis factor; NEFH, human neurofilament heavy chain; NEFL, human neurofilament light chain; 25(OH) vit D, 25-hydroxyvitamin D; CD56bright NK cells, CD56bright natural killer cells; anti-NZ, anti-natalizumab antibodies; NAbs, neutralizing antibodies; anti-AQP4, anti-aquaporin 4 antibody; anti-JC virus, antibodies against JC virus; anti-VZV, anti-varicella zoster virus antibodies.